

## End of Result Set

  Generate Collection

L1: Entry 1 of 1

File: DWPI

Jul 12, 2000

DERWENT-ACC-NO: 1999-232047  
 DERWENT-WEEK: 200036  
 COPYRIGHT 2001 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Detection and determination of phosphorylating action of a biological material

INVENTOR: MATHIS, G; PREAUDAT, M ; TRINQUET, E

## PRIORITY-DATA:

1997FR-0011721 September 19, 1997

## PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
EP 1018009 A1	July 12, 2000	F	000	G01N033/542
FR 2768817 A1	March 26, 1999	N/A	024	G01N033/533
<u>WO 9915896 A1</u>	April 1, 1999	F	000	G01N033/542

INT-CL (IPC): C12Q 1/48; G01N 33/533; G01N 33/542; G01N 33/573; G01N 33/58; G01N 33/68

ABSTRACTED-PUB-NO: FR 2768817A

## BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - Method for the detection and/or determination of phosphorylating activity of a biological material, is new.

DETAILED DESCRIPTION - Method for the detection and/or determination of phosphorylating activity of a biological material comprises contacting it with peptides containing tyrosine, serine and/or threonine attached covalently to a carrier molecule, in the presence of a non-radio marked phosphate source and specific receptors for the phosphorylated peptides or polypeptides. The detection and measurement of these is carried out by measuring an emission signal resulting from the interaction between the carrier molecule, which is a luminescent molecule or non-luminescent molecule attached to a luminescent marker or to an emission modulator, and specific receptors attached to the luminescent marker or emission signal modulator.

An INDEPENDENT CLAIM is also included for a kit for carrying out the method.

USE - The method is especially useful in measuring the phosphorylation of biologically interesting molecules such as peptides, polypeptides, proteins, and nucleotides in natural or pathological processes, or during the synthesis of nucleic acids or proteins.

ADVANTAGE - The process is more convenient than previous methods because it does not require high concentrations of substrate having numerous

potential phosphorylation sites, and it does not require the use of radioactive material, especially 32P.

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 768 817

(21) N° d'enregistrement national :

97 11721

(51) Int Cl<sup>6</sup> : G 01 N 33/533, G 01 N 33/68, 33/573, C 12 Q 1/48

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 19.09.97.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 26.03.99 Bulletin 99/12.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du  
présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

(71) Demandeur(s) : CIS BIO INTERNATIONAL SOCIETE  
ANONYME — FR.

(72) Inventeur(s) : MATHIS GERARD, TRINQUET ERIC  
et PREAUDAT MARC.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.

(54) METHODE HOMOGENE POUR LA DETECTION ET/OU LA DETERMINATION DE L'ACTIVITE  
PHOSPHORYLANTE D'UN MATERIEL BIOLOGIQUE.

(57) L'invention concerne une nouvelle méthode homogène  
pour la détection et/ ou la détermination de l'activité de  
phosphorylation (ou activité phosphorylante) d'un matériel  
biologique à l'égard d'un substrat contenant de la tyrosine  
et/ ou de la sérine et/ ou de la thréonine, ainsi qu'un kit pour  
la mise en oeuvre de cette méthode.

FR 2 768 817 - A1



L'invention concerne une nouvelle méthode homogène pour la détection et/ou la détermination de l'activité de phosphorylation (ou activité phosphorylante) d'un matériel biologique à l'égard d'un substrat contenant de la tyrosine et/ou de la sérine et/ou de la thréonine, ainsi qu'un kit pour la mise en oeuvre de cette méthode.

La phosphorylation de molécules biologiques telles que des peptides ou des protéines par des kinases est un mécanisme biologique majeur de régulation du métabolisme cellulaire.

La plupart des enzymes possédant une activité de phosphorylation ont un Km (constante de Michaelis) très élevé (généralement compris entre  $10^{-3}$  et  $10^{-5}$  M) et un très faible rendement de conversion (entre 5% et 0,001% des sites actifs du substrat sont phosphorylés).

Dans ces conditions, la détection de la phosphorylation d'un substrat n'est possible que si les sites actifs sont présents en large excès pendant la réaction. Ce large excès en sites actifs peut être obtenu soit en utilisant des concentrations élevées en substrat (si celui-ci a peu de sites actifs), soit en choisissant un substrat possédant de nombreux sites de phosphorylation.

Les mécanismes de phosphorylation ont jusqu'à maintenant été généralement étudiés par des méthodes de détection hétérogènes radioactives ou enzymatiques.

Dans ce type de méthodes, la détection de la phosphorylation du substrat fixé sur une phase solide se fait soit par la mesure de l'incorporation de  $^{32}P$  dans le substrat enzymatique, soit par l'utilisation d'un anticorps marqué (traceur isotopique, enzymatique ou fluorescent) dirigé contre le site de phosphorylation.

Ce type d'essai permet la fixation d'une grande quantité de substrat sur la phase solide et donc la détection de la phosphorylation même lorsque le substrat ne possède qu'un faible nombre de sites actifs, mais présente néanmoins des inconvénients majeurs, à savoir :

- 30 - l'utilisation fréquente de marqueurs isotopiques,
- la nécessité de processus de séparation entre les différentes étapes de l'essai pour éliminer les réactifs en excès, et

- la nécessité de maîtriser les processus de « capture » du substrat (comme par exemple lorsqu'on utilise une plaque comportant de l'avidine avec un substrat biotine).

Dans le cas d'une méthode homogène, il est souvent nécessaire que la 5 concentration du substrat soit élevée pour générer suffisamment de substrat phosphorylé à détecter. Il devient alors difficile de capturer la totalité du substrat car cela nécessiterait une quantité importante de réactif, ce qui, si le réactif est fluorescent, présente l'inconvénient de générer un bruit de fond spécifique élevé.

On a maintenant trouvé qu'il était possible de détecter la 10 phosphorylation d'un substrat à l'aide d'une méthode homogène dans laquelle on utilise une molécule porteuse luminescente à laquelle sont couplés de manière covalente une pluralité de substrats. Après la réaction enzymatique de phosphorylation, la quantité de substrat phosphorylé est révélée par la mesure 15 du signal émis par la molécule porteuse luminescente et générée par transfert d'énergie d'un récepteur spécifique du substrat phosphorylé marqué par une molécule luminescente.

Cette méthode est particulièrement utile pour mesurer la phosphorylation de molécules d'intérêt biologique, telles que par exemple des 20 peptides, des polypeptides, des protéines ou des nucléotides, dans des processus naturels ou pathologique, ou lors de procédés de synthèse comme par exemple la synthèse d'acides nucléiques ou de protéines.

Dans un premier aspect, l'invention a donc pour objet une méthode homogène pour la détection et/ou la détermination de l'activité phosphorylante 25 d'un matériel biologique à l'égard d'un substrat contenant de la tyrosine et/ou de la sérine et/ou de la thréonine, caractérisée en ce que ledit matériel biologique est mis en contact avec une pluralité de peptides ou de polypeptides contenant de la tyrosine et/ou de la sérine et/ou de la thréonine, identiques ou différents, liés de manière covalente à une molécule porteuse, en présence d'une source 30 de phosphate non radiomarqué et des récepteurs spécifiques desdits peptides ou polypeptides phosphorylés, et en ce que la détection et/ou la détermination de l'activité phosphorylante est effectuée par mesure d'un signal d'émission, ledit signal d'émission résultant d'une interaction entre ladite molécule porteuse constituée par une molécule luminescente ou une molécule non luminescente

liée à au moins un marqueur luminescent ou un modulateur du signal d'émission et lesdits récepteurs spécifiques liés à au moins un marqueur luminescent ou un modulateur du signal d'émission.

La liaison entre la molécule porteuse et, le cas échéant, le marqueur luminescent ou le modulateur du signal d'émission, ainsi que la liaison entre le récepteur spécifique et le marqueur luminescent ou le modulateur du signal d'émission peut être une liaison covalente ou non covalente.

Par « marqueur luminescent », on entend une molécule luminescente utilisée pour détecter l'interaction entre la molécule porteuse et le récepteur spécifique.

Par « modulateur du signal d'émission », on entend une molécule qui, lorsqu'elle est présente à proximité d'une molécule luminescente, modifie les caractéristiques du signal d'émission de celle-ci.

Selon les molécules utilisées respectivement comme molécule porteuse et comme récepteur spécifique et selon le mécanisme de leur interaction, un même composé luminescent peut jouer le rôle de marqueur luminescent ou de modulateur du signal d'émission.

Ledit modulateur peut être une molécule luminescente, par exemple une molécule luminescente donneur ou accepteur, ou une molécule non luminescente, par exemple un atome de nombre atomique élevé ou une molécule contenant un tel atome comme décrit par exemple dans la demande EP 0 232 348, ou encore des composés marqueurs de spin.

La molécule porteuse peut être :

- soit une molécule luminescente ayant un poids moléculaire élevé, de l'ordre de plusieurs dizaines de kdaltons, comme par exemple une molécule fluorescente telle que l'alophycyanine ou la C phycocyanine ;

- soit une molécule non luminescente, comme par exemple la thyroglobuline, liée à au moins un marqueur luminescent ou à au moins un modulateur du signal d'émission ;

- soit un solide dispersé luminescent ayant une surface suffisante pour fixer une pluralité de peptides ou polypeptides substrats ;

- soit un solide dispersé non luminescent ayant une surface suffisante pour fixer une pluralité de peptides ou polypeptides substrats, lié à au moins un marqueur luminescent ou à au moins un modulateur du signal d'émission.

La molécule porteuse peut donc être soit une molécule luminescente accepteur, soit une molécule non luminescente liée à au moins un marqueur luminescent ou à au moins un modulateur du signal d'émission.

Dans la suite de la description, on emploiera sans distinction les termes « molécule » ou « composé » pour qualifier les marqueurs luminescents ou les modulateurs liés à la molécule porteuse ou au récepteur spécifique.

Dans un aspect avantageux, la molécule porteuse est soit une molécule fluorescente accepteur, soit une molécule fluorescente donneur, soit une molécule non fluorescente liée à au moins un composé fluorescent accepteur, ou à au moins un composé fluorescent donneur.

Avantageusement, le marqueur luminescent ou le modulateur du signal d'émission lié à chacun des récepteurs spécifiques du ou des peptide(s) ou polypeptide(s) phosphorylé(s) peut être une molécule fluorescente donneur ou accepteur.

Dans un aspect préféré, la détection et/ou la détermination de l'activité de phosphorylation est effectuée par mesure du signal d'émission résultant du transfert d'énergie non radiatif entre la molécule porteuse et les marqueurs luminescents ou les modulateurs du signal d'émission liés aux récepteurs spécifiques des peptides ou polypeptides phosphorylés.

Ainsi, le signal d'émission lumineuse permettant la détection et/ou la détermination de l'activité phosphorylante recherchée peut être généré soit par transfert d'énergie non radiatif des marqueurs luminescents ou des modulateurs du signal d'émission liés aux récepteurs spécifiques à la molécule porteuse, soit inversement par transfert d'énergie non radiatif des marqueurs luminescents ou des modulateurs du signal d'émission de la molécule porteuse aux marqueurs luminescents liés aux récepteurs spécifiques.

Par "transfert d'énergie entre la molécule porteuse et les molécules luminescentes marqueurs ou les modulateurs du signal d'émission liés aux récepteurs spécifiques des peptides ou polypeptides phosphorylés", on entend donc les 2 types de mécanismes ci-dessus.

Le transfert d'énergie non radiatif, dont le principe est notamment décrit dans G.Mathis et al., Clin. Chem., 1993, 39, 1953-1959 est réalisé lorsque les conditions suivantes sont remplies :

- d'une part, le composé accepteur possède un spectre d'absorption qui recouvre au moins partiellement le spectre d'émission du donneur et présente une absorbance molaire élevée dans cette zone de recouvrement, et un spectre d'émission dans une gamme de longueur d'ondes où le donneur présente une émission intrinsèque faible ;
- 5 - d'autre part, l'accepteur et le donneur se situent à proximité l'un de l'autre.
- 10

La quantité de peptides ou de polypeptides liés de manière covalente à la molécule luminescente porteuse peut être d'environ 2 à 1000 par molécule luminescente porteuse.

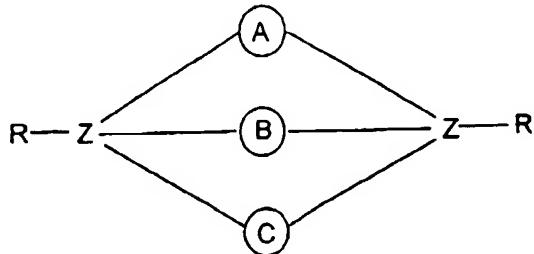
Les récepteurs spécifiques des peptides ou polypeptides phosphorylés peuvent être par exemple choisi parmi les anticorps monoclonaux ou polyclonaux ou parmi les peptides, polypeptides et protéines spécifiques de la reconnaissance du site phosphorylé.

20 Dans un aspect préféré, le composé luminescent lié au récepteur spécifique du ou des peptide(s) ou polypeptide(s) phosphorylé(s) ou à la molécule porteuse, en tant que marqueur luminescent ou de modulateur du signal d'émission selon le mécanisme de l'interaction entre ladite molécule porteuse et ledit récepteur spécifique, est un chelate, un cryptate ou un complexe macrocyclique d'ion terre rare.

Dans la suite de la description, les termes "chelate", et "cryptate" ainsi que la nomenclature des macrocycles et polycycles utilisables sont tels que définis par J.M.Lehn dans Struct. Bonding (Berlin), 16, 1 1973 et dans Acc. Chem. Res., 11, 49 (1979).

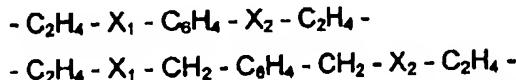
30 Ledit composé fluorescent donneur est de préférence un cryptate de terre rare choisi de préférence parmi les cryptates de terbium, d'europium, de samarium ou de dysprosium.

Selon un aspect préféré, ledit cryptate de terre rare est constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique de formule

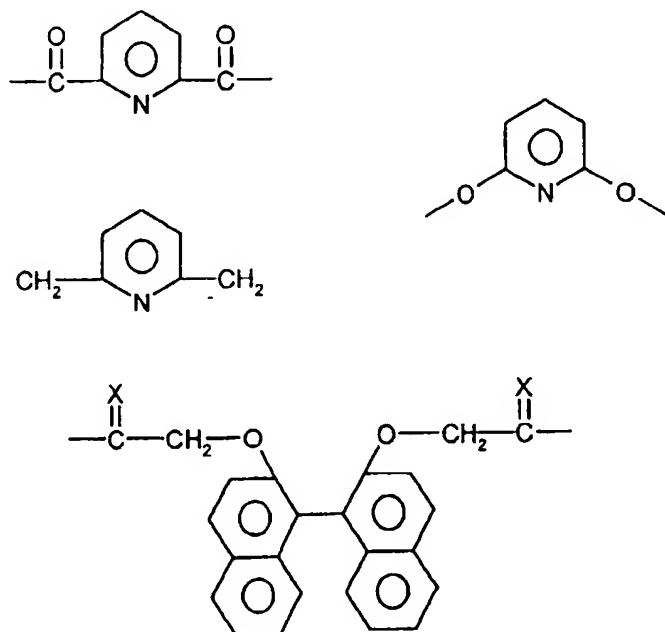


dans laquelle Z est un atome ayant 3 ou 4 valences, R est rien ou représente l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe amino ou un radical hydrocarboné, les radicaux bivalents (A), (B) et (C), sont indépendamment l'un de l'autre des chaînes hydrocarbonées qui contiennent éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes et sont éventuellement interrompues par un hétéromacrocycle, au moins l'un des radicaux (A), (B) et (C) comportant de plus au moins un motif moléculaire ou étant essentiellement constitué par un motif moléculaire, ledit motif moléculaire possédant une énergie de triplet supérieure à celle du niveau émissif de l'ion de terre rare complexé.

De préférence, il s'agit d'un cryptate de formule (I) ci-dessus dans laquelle le motif moléculaire est choisi parmi la phénanthroline, l'anthracène, le benzène, le naphtalène, les bi- et ter-phényle, l'azobenzène, l'azopyridine, la pyridine, les bipyridines, les bisquinoléines et les composés de formules ci-après :



$X_1$  et  $X_2$  pouvant être identiques ou différents désignent l'oxygène, l'azote ou le soufre,



X étant l'oxygène ou l'hydrogène.

Dans un aspect avantageux, le composé fluorescent est un cryptate de terre rare constitué de l'ion terbium ou europium complexé par l'un des composés macrocycliques ci-après :

5 (22)phénanthroline ; (22)phénanthroline amide ; (22)anthracène ;  
 (22)anthracène amide ; (22)bi-isoquinoléine ; (22)biphényl-bis-pyridine ;  
 (22)bipyridine ; (22)bi-pyridine amide ; les macropolycycles tris-bipyridine, tris-  
 10 phénanthroline, phénanthroline-bis-bipyridine, bi-isoquinoléine-bis-bipyridine, bis-  
 bipyridine diphénylbipyridine.

Un composé fluorescent particulièrement avantageux est le cryptate d'europium Eu tris bipyridine.

De tels composés sont par exemple décrits dans le brevet EP 180 492.

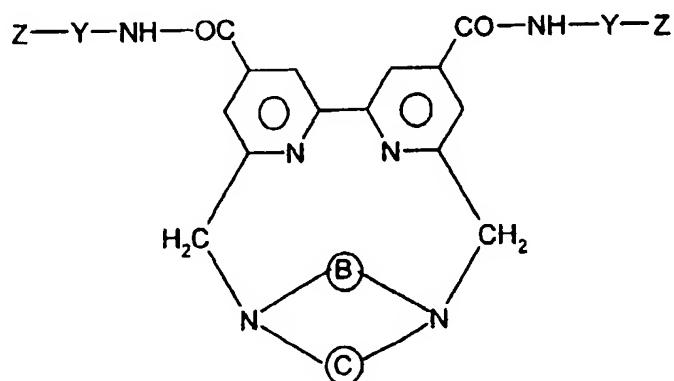
15 On peut également utiliser des composés macrocycliques complexant des ions de terre rare dans lesquels le motif moléculaire est choisi parmi les bipyrazines, les bipyrimidines et les hétérocycles azotés comportant des groupes N-oxydes.

Des composés macrocycliques à unités bipyrazines sont décrits dans F. Bodar-Houillon et al., New J. Chem., 1996, 20, 1041-1045.

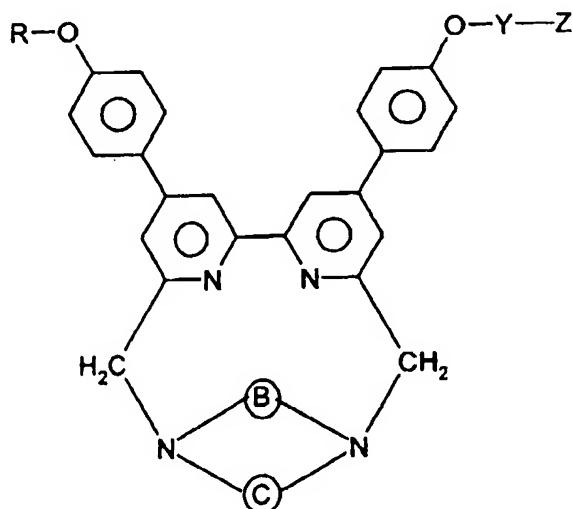
Des composés macrocycliques à unités bipyrimidines sont décrits dans J. M. Lehn et al., Helv. Chim. Acta, 1992, 75, 1221.

Des composés macrocycliques comprenant des hétérocycles azotés comportant des groupes N-oxydes sont décrits dans J.M. Lehn et al., Helv. Chim. Acta, 1991, 74, 572 et dans le brevet EP 0 601 113.

Le cryptate de terre rare utilisé comme composé fluorescent donneur peut également être constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique répondant à l'une des formules II ou III ci-après :



II

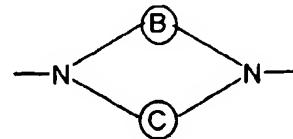


III

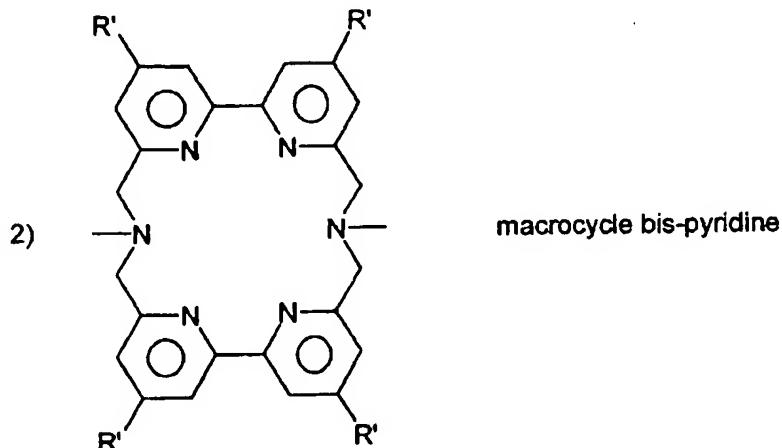
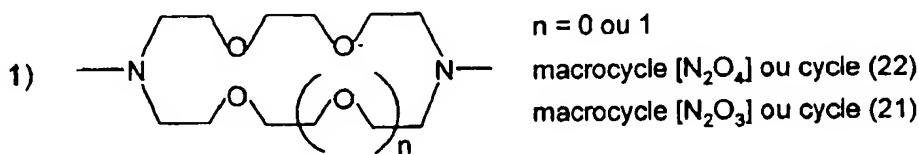
10

dans lesquels :

- le cycle de formule



est l'un des cycles suivants :



5

- Y est un groupe ou un bras d'espacement qui est constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en  $C_1$  à  $C_{20}$  contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons ou triples liaisons et/ou étant éventuellement interrompus par un ou plusieurs 10 hétéroatomes tels que l'oxygène, l'azote, le soufre ou le phosphore, parmi les groupes cycloalkylène en  $C_5$  à  $C_8$  ou parmi les groupes arylène en  $C_6$  à  $C_{14}$ , lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate ;

- Z est un groupe fonctionnel susceptible de se lier de façon covalente 15 avec une substance biologique ;

- R est un groupe méthyle ou représente le groupe -Y-Z ;

- R' est l'hydrogène ou un groupe -COOR" dans lequel R" est un groupe alkyle en C<sub>1</sub> à C<sub>10</sub> et représente de préférence le groupe méthyle, éthyle ou tertiobutyle ou bien R' est un groupe -CO-NH-Y-Z.

De tels composés sont décrits par exemple dans le brevet EP 321 353.

5

Dans la méthode selon l'invention, ledit composé fluorescent peut être lié au récepteur spécifique ou à la molécule porteuse soit directement, soit par l'intermédiaire d'un bras d'espacement.

10

Ce bras d'espacement est par exemple constitué par un radical organique bivalent, choisi parmi les groupes alkylène linéaires ou ramifiés en C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, contenant éventuellement une ou plusieurs doubles liaisons et/ou éventuellement interrompus par un ou plusieurs hétéroatomes, tels que l'oxygène, l'azote, le soufre ou le phosphore ; les groupes carbamoyle et carboxamido ; les groupes cycloalkylène en C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub> et les groupes arylène en C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, lesdits groupes alkylène, cycloalkylène ou arylène étant éventuellement substitués par des groupes alkyle, aryle ou sulfonate.

15

Dans un aspect préféré, on utilisera en tant que composé fluorescent donneur lié au récepteur spécifique un cryptate d'europium et, en tant que molécule porteuse ou composé fluorescent accepteur lié à la molécule porteuse, l'allophycocyanine, l'allophycocyanine B, un dérivé d'allophycocyanine chimiquement modifié, la C phycocyanine, la R phycocyanine et les cyanines.

20

Dans un autre aspect avantageux, on utilisera en tant que composé fluorescent donneur lié au récepteur spécifique un cryptate de terbium et en tant que molécule porteuse ou composé fluorescent accepteur lié à la molécule porteuse, les rhodamines, la thionine, la R phycocyanine, la phycoerythrocyanine, la C phycoerythrine, la B phycoerythrine, la R phycoerythrine et les cyanines.

Des composés fluorescents utilisables également comme composés accepteurs sont les complexes phycobiliprotéine-peptide de liaison décrits dans la demande WO96/42016.

25

Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne également un kit pour la détection et/ou la détermination de l'activité phosphorylante d'un matériel biologique à l'égard d'un substrat contenant de la et/ou de la sérine et/ou de la thréonine, caractérisé en ce qu'il contient au moins une molécule porteuse à

laquelle sont fixés de manière covalente une pluralité de peptides ou de polypeptides, identiques ou différents, et au moins un récepteur spécifique desdits peptides ou polypeptides phosphorylés, ledit récepteur étant lié à au moins un marqueur luminescent ou un modulateur du signal d'émission.

5 La molécule porteuse est telle que définie plus haut, c'est-à-dire qu'elle peut être luminescente de manière intrinsèque ou par liaison à au moins un marqueur luminescent ou un modulateur du signal d'émission.

10 Avantageusement, la molécule porteuse et le marqueur luminescent ou le modulateur du signal d'émission lié au récepteur spécifique de ce kit sont des composés fluorescents.

Dans un aspect préféré, le composé luminescent (marqueur luminescent ou modulateur du signal d'émission) lié au récepteur spécifique et la molécule porteuse sont respectivement des composés fluorescents donneur et accepteur.

15 Le composé luminescent lié au récepteur spécifique dans le kit selon l'invention peut être le cryptate d'europium Eu trisbipyridine ou le cryptate de terbium Tb trisbipyridine.

20 Avantageusement, le kit selon l'invention contient en outre un milieu tampon approprié, une source de phosphate non radiomarqué et des instructions pour la mise en oeuvre de la méthode de détection et/ou de la détermination de l'activité phosphorylante d'un matériel biologique décrite plus haut.

L'invention est illustrée par l'exemple ci-après.

Exemple 1 : Détection de la phosphorylation du peptide SRC

25 Le peptide SRC est un substrat de la tyrosine kinase du récepteur du facteur de croissance épidermique, également dénommé EGF pour "Epidermal Growth Factor". C'est un peptide de 11 acides aminés contenant un seul motif tyrosine et présentant la structure suivante :

[H]-Leu-Ile-Glu-Asp-Ala-Glu-Tyr-Ala-Ala-Gly-[OH]

30 Les abréviations utilisées ci-après sont les suivantes :

DTT = dithiotreitol

EuTBP = cryptate d'europium Eu trisbipyridine diamine

BSA = sérum albumine bovine

IgG = immunoglobuline G

MHS = maléimidohexanoyl-N-hydroxy-succinimidester

SPDP = N-succinimidyl 3(2-pyridylthio)propionate

5 Sulfo-SMCC = sulfosuccinimidyl 4-n-maléimidométhyl)cyclohexane.

1) Conjugaison de la molécule luminescente porteuse luminescente avec le peptide substrat

On utilise un dérivé d'alophycocyanine chimiquement modifié (XL<sub>665</sub>, Cis 10 bio international) dont le poids moléculaire élevé autorise son marquage par de nombreux peptides possédant chacun un site de phosphorylation.

a) Activation de XL<sub>665</sub> par SPDP

15 A 6 mg d' XL<sub>665</sub> à 3,45 mg/ml dans un tampon phosphate 100 mM pH 7,0, on ajoute une solution de 80 mM de SPDP dans l'éthanol absolu dans une préparation de 60 moles d'activateur par mole de XL<sub>665</sub>.

Après 30 minutes d'activation à température ambiante on ajoute une solution de 200 mM de DTT dans un tampon phosphate 100 mM pH 7,0 dans une proportion de 5 moles de réducteur par mole d'activateur.

20 Après 15 minutes à température ambiante, les produits réactionnels indésirables sont éliminés par chromatographie d'exclusion-diffusion sur colonne gel G25 superfine dans un tampon phosphate 100 mM pH 6,5, EDTA 5 Mm.

Le produit est conservé à 4°C avant couplage.

25 b) Activation du peptide par le MHS

A 4 mg de peptide (2,6 pmoles), on ajoute une solution 220 mM de MHS dans l'acétonitrile dans une proportion de 4 moles d'activateur par mole de peptide.

30 Après 30 minutes à température ambiante, les produits réactionnels indésirables sont éliminés par chromatographie d'exclusion-diffusion sur colonne gel Superdex 30 ® (PHARMACIA) dans un tampon phosphate 100 mM pH 7,0.

c) Couplage peptide-maléimide / XL<sub>665</sub>-SH

De façon similaire à celle décrite plus haut, on fait réagir les fonctions maléimides avec les fonctions thiols fixées sur la XL<sub>665</sub> dans des proportions molaires de 100 peptide par XL<sub>665</sub>.

5                   Après 18 heures d'incubation à 40°C et blocage des groupements thiols (éventuellement restés libres) par N-éthylmaléimide, le peptide non couplé est éliminé par chromatographie d'exclusion-diffusion sur colonne TSK 3000 SW (MERCK) en tampon phosphate 100 mM pH 7,0.

On obtient un conjugué comportant entre 20 et 40 peptides par molécule  
10                   XL<sub>665</sub>.

2) Préparation du conjugué anticorps anti-phosphotyrosine/cryptate d'Europium Eu trisbipyridine

15                   a) Activation des IgG PY20 par le SPDP

5 mg d'IgG PY20 (Transduction Laboratories) à raison de 10 mg/ml dans un tampon phosphate 100 mM, pH 7,0 sont activés par l'ajout d'une solution de SPDP (Pierce, USA) à raison de 6,4 mM dans du dioxane dans un rapport molaire de 7,5 SPDP par IgG P420.

20                   Après 35 min d'activation à température ambiante, l'IgG pyridine-2-thione est purifiée sur colonne G25 superfine dans un tampon phosphate 100 mM, EDTA 5mM, pH 6,5.

25                   Les protéines sont concentrées et les groupes 2-pyridyl disulfides sont réduits par une solution de DTT (Sigma, USA) ayant une concentration finale de 19 mM pendant 15 min à température ambiante. Le DTT et la pyridine-2-thione sont éliminés par purification sur colonne G25 superfine en tampon phosphate 100 mM, EDTA 5 mM, pH 6,5. La concentration en IgG-SH est déterminée à 280 nm avec un  $\epsilon_{280\text{nm}}$  de 210 000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

b) Préparation des conjugués IgG PY20-EuTBP

A 5 mg (5  $10^{-6}$  moles) de Eu TBP (cryptate d'Europium Eu trisbipyridine diamine préparé comme décrit dans le brevet EP 321 353, exemples 3 et 4 ?) est ajoutée une solution à 25 mM de sulfo-SMCC, en tampon phosphate 20 mM, 5 diméthylformamide 10 % (v/v pH 7,0) dans une proportion de 2,5 moles d'activateur par mole de Eu TBP.

Après 45 min d'activation à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré à 0,8  $\mu$ m afin d'éliminer le précipité éventuellement formé. Les produits réactionnels indésirables (sulfo-SMCC, N-hydroxysuccinimide, acide 10 (N-maléimidométhyl)carboxylique) sont éliminés par chromatographie échangeuse d'ions sur colonne Mono Q (Pharmacia, Suède) en tampon phosphate 20 mM diméthylformamide 10 % (v/v), pH 7,0 sous choc de NaCl. La concentration en Eu TBP maléimide est déterminée à 307 nm avec un  $\epsilon_{307\text{ nm}}$  de 25 000  $M^{-1} \text{cm}^{-1}$  ainsi que le rapport  $A_{307\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ .

15 De façon similaire à celle décrite plus haut, on fait réagir les fonctions maléimides avec les fonctions thiols fixés sur l'anticorps, dans des proportions molaires variant de 10 à 30 Eu TBP maléimide par IgG PY20-SH.

Après 18 heures d'incubation à 4°C et blocage des groupements thiols (éventuellement restés libres) par N-éthylmaléimide, le Eu TBP non couplé est 20 éliminé par dialyse en tampon phosphate 100 Mm pH 7,0 à 4°C jusqu'à épuisement (plus de fluorescence dans les bains de dialyse).

Les caractéristiques du conjugué sont déterminées par ses absorptions à 307 nm et à 280 nm en utilisant les valeurs suivantes en tenant compte de l'absorption propre du cryptate déterminée par le rapport  $A_{307\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ .

25 Eu TBP-maléimide :

$$\epsilon_{307\text{nm}} = 25\,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

$A_{307\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  = déterminée expérimentalement.

IgG PY20-SH :

$$\epsilon_{280\text{nm}} = 210\,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

Des cellules A431 (SIGMA) contenant un récepteur de l'EGF sont préactivées 10 min à température ambiante par de l'EGF. Le tampon de phosphorylation est un tampon TRIS/MES 60 mM, pH 7,4 contenant 30  $\mu$ M d'ATP, 50 mM de Mg<sup>++</sup> et 10 mM de Mn<sup>++</sup>.

5 On ajoute successivement dans les puits « essais » d'une microplaqué à 96 puits :

- 10  $\mu$ l de cellules A431 préactivées,
- 10  $\mu$ l de conjugué XL<sub>665</sub>-peptides SRC
- 30  $\mu$ l de tampon de phosphorylation.

10 Dans les puits « blancs » servant de contrôle, on introduit 10  $\mu$ l de conjugué tampon XL<sub>665</sub>-peptides et 40  $\mu$ l de tampon de phosphorylation. On incube ensuite 30 min à température ambiante.

#### 4) Révélation

15 On ajoute successivement dans chaque puits de la microplaqué :

- 50  $\mu$ l d'anticorps/anti-phosphotyrosine marqué au cryptate Eu trisbipyridé
- 100  $\mu$ l de tampon phosphate 0,1 M ; pH 7 ; KF 0,4 M ; BSA 0,1 %.

Après incubation 30 min à température ambiante, la lecture de la fluorescence est effectuée à 620 nm et 665 nm à l'aide d'un fluorimètre à laser prototype, décrit ci-après :

20 Un laser pulsé à azote (LASER SCIENCE INC., modèle LS1-337ND) est utilisé comme source d'excitation (longueur d'onde à 337,1 nm). La durée des pulsations est spécifiée à 3 nanosecondes et est répétée sous une fréquence de 10 Hertz. Le faisceau passe à travers un filtre (CORNING) afin d'éliminer toute 25 lumière parasite à l'excitation autre que 337 nm.

Après être rentré dans la chambre de mesure, le faisceau est réfléchi par un filtre dichroïque, placé à 45 degrés, qui a la propriété de réfléchir les ultraviolets et de pouvoir transmettre la lumière visible.

30 Le faisceau réfléchi par le filtre dichroïque est focalisé sur le puits à mesurer d'une microplaqué par une lentille en silice fondu. L'émission de fluorescence est collectée selon un angle solide de 20 degrés, collimatée par la

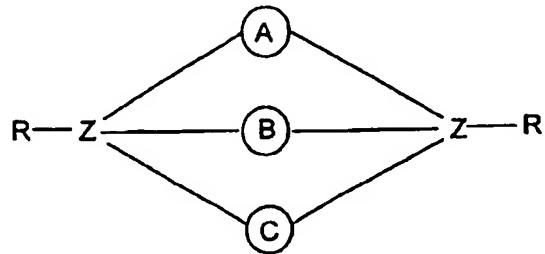
6. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le récepteur spécifique est lié à un composé fluorescent accepteur et la molécule porteuse luminescente est une molécule fluorescente donneur ou est liée à un composé fluorescent donneur.

5 7. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la quantité de peptides ou polypeptides liés de manière covalente à la molécule porteuse luminescente est de 2 à 1000.

8. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le récepteur spécifique est lié à un chélate, un cryptate ou un 10 complexe macrocyclique d'ion terre rare.

9. Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que le récepteur spécifique est lié à un chélate, un cryptate ou un complexe macrocyclique d'europium, de terbium, de dysprosium, de samarium ou de néodymium.

10. Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que le récepteur spécifique est lié à un cryptate de terre rare constitué d'au moins un sel de terre rare complexé par un composé macropolycyclique de formule 15



dans laquelle Z est un atome ayant 3 ou 4 valences, R est rien ou représente 20 l'hydrogène, le groupe hydroxy, un groupe amino ou un radical hydrocarboné, les radicaux bivalents (A), (B) et (C), sont indépendamment l'un de l'autre des chaînes hydrocarbonées qui contiennent éventuellement un ou plusieurs hétéroatomes et sont éventuellement interrompues par un hétéromacrocycle, au moins l'un des radicaux (A), (B) et (C) comportant de plus 25 au moins un motif moléculaire ou étant essentiellement constitué par un motif moléculaire, ledit motif moléculaire possédant une énergie de triplet supérieure à celle du niveau émissif de l'ion de terre rare complexé.

11. Méthode selon la revendication 10, caractérisée en ce que le composé fluorescent lié au récepteur spécifique est un cryptate de terre rare constitué de l'ion terbium ou europium complexé par l'un des composés macrocycliques ci-après :

5 (22)phénanthroline ; (22)phénanthroline amide ; (22)anthracène ; (22)anthracène amide ; (22)bi-isoquinoléine ; (22)biphényl-bis-pyridine ; (22)bipyridine ; (22)bi-pyridine amide ; les macropolycycles tris-bipyridine, tris-phénanthroline, phénanthroline-bis-bipyridine, bi-isoquinoléine-bis-bipyridine, bis-bipyridine diphénylbipyridine.

10 12. Méthode selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit composé fluorescent est le cryptate deuropium Eu trisbipyridine.

13. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'on utilise un cryptate deuropium en tant que composé fluorescent donneur lié au récepteur spécifique et en tant que molécule porteuse ou 15 composé fluorescent accepteur lié à la molécule porteuse, l'alophycocyanine, l'alophycocyanine B, les dérivés d'alophycocyanine chimiquement modifiés, la C phycocyanine, la R phycocyanine et les cyanines.

14. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'on utilise un cryptate de terbium en tant que composé fluorescent 20 donneur lié au récepteur spécifique et, en tant que molécule porteuse ou composé fluorescent accepteur lié à la molécule porteuse, les rhodamines, la thionine, la R phycocyanine, la phycoerythrocyanine, la C phycoerythrine, la B phycoerythrine, la R phycoerythrine et les cyanines.

15. Méthode selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que le 25 composé fluorescent donneur lié au récepteur spécifique est le cryptate deuropium Eu trisbipyridine ou le cryptate de terbium Tb trisbipyridine.

16. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisée en ce que les récepteurs spécifiques sont choisis parmi les anticorps polyclonaux et monoclonaux, ou parmi les peptides, polypeptides et protéines spécifiques de 30 la reconnaissance du site phosphorylé.

17. Kit pour la détection et/ou la détermination de l'activité phosphorylante d'un matériel biologique à l'égard d'un substrat contenant de la et/ou de la sérine et/ou de la thréonine, caractérisé en ce qu'il contient au moins une molécule

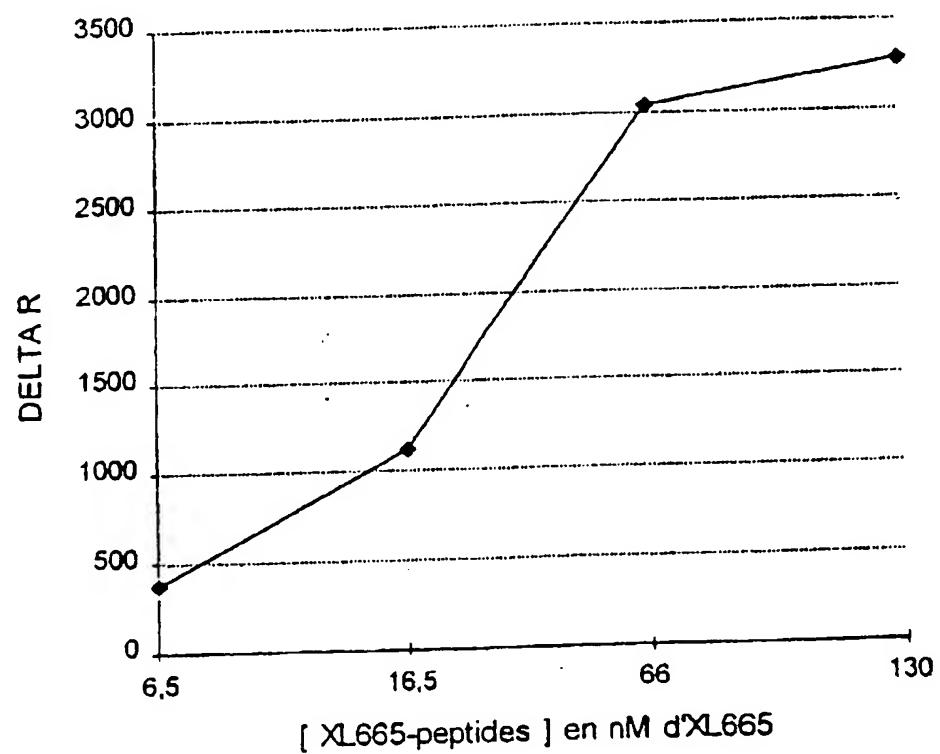
porteuse à laquelle sont fixés de manière covalente une pluralité de peptides ou de polypeptides, identiques ou différents, et au moins un récepteur spécifique desdits peptides ou polypeptides phosphorylés, ledit récepteur étant lié à au moins un marqueur ou un modulateur du signal d'émission.

- 5 18. Kit selon la revendication 17, caractérisé en ce que la molécule porteuse et la molécule luminescente marqueur du récepteur spécifique sont des molécules fluorescentes.
19. Kit selon la revendication 18, caractérisé en ce que le marqueur luminescent ou le modulateur du signal d'émission lié au récepteur spécifique et 10 la molécule porteuse sont respectivement des molécules fluorescentes donneur et accepteur.
20. Kit selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, caractérisé en ce que le composé luminescent lié au récepteur spécifique est le cryptate d'europium Eu trisbipyridine ou le cryptate de terbium Tb trisbipyridine.
- 15 21. Kit selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, caractérisé en ce qu'il contient en outre un milieu tampon approprié, une source de phosphate non radiomarqué et des instructions pour la mise en œuvre de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 16.

2768817

1/1

FIGURE 1



REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2768817

N° d'enregistrement  
nationalFA 548628  
FR 9711721

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	US 5 439 797 A (TSIEN ROGER Y ET AL) 8 août 1995 * exemples I-IV *	1-7,17, 18,21 8-16, 19-21
Y	GADELLA T W J JR ET AL: "Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy: A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation." JOURNAL OF CELL BIOLOGY 129 (6). 1995. 1543-1558. ISSN: 0021-9525, XP002065454 * le document en entier *	1-7,17, 18,21
Y	BROUDY V C ET AL: "Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer." BLOOD 91 (3). 1998. 898-906. ISSN: 0006-4971, XP002065455 * le document en entier *	1-7,17, 18,21
Y	HORROCKS W D JR ET AL: "MEASUREMENT OF DISTANCE BETWEEN FLUORESCENT AMINO-ACID RESIDUES AND METAL ION BINDING SITES QUANTITATION OF ENERGY TRANSFER BETWEEN TRYPTOPHAN AND TERBIUM III OR EUROPIUM III IN THERMO LYSIN EC-3.4.24.4." BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 100 (1). 1981. 111-117. CODEN: BBRCA9 ISSN: 0006-291X, XP002065456 * le document en entier *	1-21
E	WO 98 09169 A (TULARIK INC) 5 mars 1998 * revendication 1 *	1
	---	-/-
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
19 mai 1998		Wells, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-sérieuse P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

REPUBLIQUE FRANCAISE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2768817

N° d'enregistrement  
nationalFA 548628  
FR 9711721

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie		
E	WO 98 02571 A (UNIV CALIFORNIA ;TSIEN ROGER Y (US); CUBITT ANDREW B (US)) 22 janvier 1998 * revendication 1 *---	1
D,Y	WO 93 05049 A (CIS BIO INT) 18 mars 1993 * le document en entier * & EP 0 601 113 A ---	8-16, 19-21
D,Y	US 5 279 943 A (MATHIS GERARD ET AL) 18 janvier 1994 * le document en entier * & EP 0 232 348 A ---	8-16, 19-21
D,Y	EP 0 180 492 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 7 mai 1986 * le document en entier * ---	8-16, 19-21
Y	WO 96 00901 A (UNIV CALIFORNIA) 11 janvier 1996 * le document en entier * ---	8-16, 19-21
D,A	WO 96 42016 A (CIS BIO INT ;MATHIS GERARD (FR)) 27 décembre 1996 * le document en entier * -----	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL6)
1		
Date d'achèvement de la recherche		Examenateur
19 mai 1998		Wellis, A
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-sertile P : document interne		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant		
EPO FORM 1502 (02-91)		